

newly introduced methyl group at C-4 seems to have arisen by a reaction between the methyl iodide produced during the halolysis and the anion formed at C-4 by loss of carbon dioxide from the carboxylate ion.

Partial acetylation of **7** gave the amorphous 11-hydroxy diacetate (**8**); UV [λ_{\max} (EtOH) 217, 243 nm (ϵ_{\max} 10260, 10530)]; IR [ν 3575, 1764, 1742 cm^{-1}]; NMR (CDCl_3) [δ 1.98, 2.28 (each 3H, singlet), 4.13 (1H, broad doublet, $J = 4$ Hz, collapsing to a broad singlet after deuterium exchange of -OH at δ 3.00) and 5.13 (1H, broad singlet)]. Oxidation of **8** to the 11-ketone (**9**), m.p. 228–231°C, caused a disappearance of the H-11 absorbance at δ 4.13 while that for H-12 was retained at δ 5.08 (1H, singlet). Reduction of **9** with chromous chloride yielded (**10**), m.p. 185–187°C, identical in every respect with a compound of the same structure prepared from anthothecol (**2**) by a method previously described⁴.

- 1 J. D. Connolly, K. H. Overton and J. Polonsky, in: Progress in Phytochemistry, vol. 2, p. 385. Ed. L. Reinhold and Y. Liwischitz. Interscience, London 1970.
- 2 R. Hodges, S. G. McGeachin and R. A. Raphael, J. chem. Soc. 1963, 2515.
- 3 I. J. Grant, J. A. Hamilton, T. A. Hamor, J. M. Robertson and G. A. Sim, J. chem. Soc. 1963, 2506.
- 4 C. W. L. Bevan, J. W. Powell and D. A. H. Taylor, J. chem. Soc. 1963, 980.
- 5 C. W. L. Bevan, A. H. Rees and D. A. H. Taylor, J. chem. Soc. 1963, 983.
- 6 D. A. H. Taylor, Chem. Commun. 1967, 500.
- 7 W. R. Chan and D. R. Taylor, Chem. Commun. 1966, 206.
- 8 Initially desacetylthirtin was reported as being non-crystalline, but subsequently gave crystals, m.p. 117–120°C.
- 9 B. A. Burke, W. R. Chan and D. R. Taylor, unpublished results.
- 10 S. M. Kupchan, personal communication.
- 11 W. Hertz and H. J. Wahlborg, J. org. Chem. 30, 1881 (1965).
- 12 P. D. G. Dean, J. chem. Soc. 1965, 6655.

Über die Bildung von Diäthylnitrosamin durch Reaktion von Diäthylamin mit Stickstoffdioxid in der Gasphase

Formation of diethylnitrosamine by reaction of diethylamine with nitrogen dioxide in the gas phase

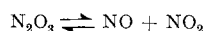
P. Gehlert und W. Rolle

Forschungsstelle für chemische Toxikologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Johannisallee 20, DDR-701 Leipzig (Deutsche Demokratische Republik), 20. Oktober 1976

Summary. Nitrogen dioxide and gaseous diethylamine form N-nitrosodiethylamine and diethylammoniumnitrate in a very fast reaction at 25°C.

Reaktionen von sekundären aliphatischen und aromatischen Aminen mit salpetriger Säure bzw. ihren Derivaten in wässriger Lösung sind in der Literatur unter den verschiedensten Gesichtspunkten (Vorkommen, Bildung, Kinetik, Katalyse, Karzinogenese) eingehend beschrieben worden. Wenig ist jedoch über die Nitrosierung von sekundären Aminen durch Stickoxide in der Gasphase bekannt^{1–6}, obwohl das Auffinden von kanzerogenen N-Nitrosoverbindungen in der Luft von industriellen Ballungsgebieten^{7–10} dringend eine genauere Kenntnis über die dafür verantwortlichen Vorgänge verlangt. In Analogie zu der Umsetzung im wässrigen Medium wird von den meisten Autoren angenommen, dass letztlich auch hier – wie unter bestimmten experimentellen Bedingungen im wässrigen Milieu – Distickstofftrioxid das nitrosierende Agens darstellt.

Das bedeutet, dass für die Nitrosierung von sekundären Aminen in der Gasphase entsprechend dem Gleichgewicht¹¹



sowohl NO als auch NO₂ anwesend sein müssen und dass die Nitrosierungsgeschwindigkeit bzw. der Reaktionsumsatz bei einem äquimolaren Verhältnis von Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid ein relatives Maximum durchläuft.

Spincer¹ vertritt allerdings – fussend auf experimentellen Ergebnissen – die Meinung, dass zumindest im Fall des Dimethylamins Stickstoffdioxid auch ohne Anwesenheit von Stickstoffmonoxid in der Gasphase befähigt ist, unter Dimethylnitrosaminbildung zu reagieren. Allerdings werden keine experimentellen Einzelheiten über Ausgangskonzentrationen an Dimethylamin bzw. Stickstoffdioxid, Bilanz und Kinetik dieser Umsetzung angeführt. Im Rahmen unserer eigenen experimentellen Untersu-

chungen zum Verhalten von Diäthylamin gegenüber Stickstoffdioxid in der Gasphase wurden die Reaktionspartner im Konzentrationsbereich von etwa 4×10^{-6} bis 6×10^{-5} Mol/l unter weitgehendem Ausschluss von Feuchtigkeit umgesetzt. In allen untersuchten Konzentrationsbereichen entstehen als Endprodukte Diäthylnitrosamin und Diäthylammoniumnitrat im Molverhältnis 1:1 (Mittelwert aller Versuche in der Tabelle gleich 1,06:1), sowohl bei Diäthylamin- als auch bei Stickstoffdioxid-Überschuss. Die Bildung des Diäthylammoniumnitrates kann sofort nach Reaktionsbeginn in Form weisser Nebel (Aerosol) beobachtet werden.

- 1 D. Spincer und D. T. Westcott, Vortrag anlässlich des 4. Meetings «On the Analysis and Formation of N-Nitroso Compounds», Tallinn, Estonia (UdSSR), Okt. 1975.
- 2 G. B. Neurath, M. Dünker und F. G. Pein, Vorträge Tallinn, Okt. 1975¹.
- 3 G. Neurath, Experientia 23, 400 (1967).
- 4 G. Neurath, B. Pirmann, W. Lüttich und H. Wichern, Beitr. Tabforsch. 3, 215 (1965).
- 5 Brit. Patent 772 331, publ. 10. April 1957.
- 6 Brit. Patent 772 081, publ. 10. April 1957.
- 7 E. Gläser, Dissertation TU Dresden, DDR (1970).
- 8 K. Bretschneider und J. Matz, Arch. Geschwulstforsch. 42, 36 (1973).
- 9 D. H. Fine, D. P. Rounbehler und N. M. Belcher, Vortrag Tallinn, Okt. 1975¹.
- 10 D. Shapley, Science, Wash., 191, 268 (1976).
- 11 A. J. Vosper, J. chem. Soc., Dalton Transact. 1976, 135.
- 12 M. Bodenstein, Z. phys. Chem. 100, 68 (1922).
- 13 K.-H. Becker und U. Schurath, Staub-Reinhalt. Luft 35, 156 (1975).
- 14 A. D. Yoffe und P. Gray, J. chem. Soc., Lond. 1951, 1412.
- 15 A. M. Fairlie, jr, J. J. Carberry und J. C. Treacy, J. Am. chem. Soc. 75, 3786 (1953).

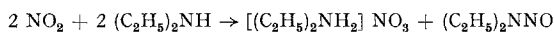
Reaktion von Diäthylamin mit Stickstoffdioxid in der Gasphase bei 25 °C

Nr.	C ⁰ NO ₂ (Mol/l × 10 ⁶)	C ⁰ A (Mol./l × 10 ⁶)	Reaktionszeit (Min.)	C ^E NO ₂ (Mol/l × 10 ⁷)	C ^E NA (Mol/l × 10 ⁶)	nSalz*** (Mol × 10 ⁶)	Reaktionsumsatz*
1	4,59	5,85	15	8,73	2,01	4,55	0,81
2	5,13	12,87	105	4,04	2,82	5,42	0,92
3	5,57	9,17	70	11,18	3,49	7,70	0,85
4	9,81	16,14	960	5,58	5,72	12,35	0,94
5	10,60	15,20	25	8,38	6,48	11,50	0,92
6	10,97	16,10	10	9,78	6,25	10,41	0,91
7	26,00	59,50	20	13,12	12,61	29,59	0,95
8**	4,95	10,04	120	4,19	2,68	4,91	0,93
9**	10,65	12,67	14	11,73	6,16	9,26	0,89
10	10,91	14,18	5760	6,14	3,31	11,50	0,94
11	9,12	14,44	2	11,18	3,51	7,60	0,88
12	10,34	12,75	3	16,79	3,80	12,10	0,84
13	11,39	16,07	2	15,64	4,21	11,34	0,86
14	10,52	5,03	27	55,87	1,74	3,85	—
15	10,10	3,87	20	36,60	1,72	3,76	—
16	12,82	3,73	23	64,53	2,12	3,71	—

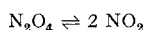
C⁰ NO₂; C⁰ A = Anfangskonzentrationen von Stickstoffdioxid bzw. Diäthylamin. C^E NO₂; C^E NA = Endkonzentrationen von Stickstoffdioxid bzw. Diäthylnitrosamin. nSalz = Endmenge von Diäthylammoniumnitrat.

* Reaktionsumsatz = $1 - \frac{C^E \text{ NO}_2}{C^0 \text{ NO}_2}$. ** Reaktion bei Dunkelheit. *** Volumen des Reaktionskolbens = 2,237 l.

Die in der Tabelle dargestellten Ergebnisse der Nitrosierungsreaktion lassen sich in Analogie zu den ausführlich untersuchten Reaktionen von Stickstoffdioxid mit Alkoholen in der Gasphase^{14,15} zwanglos durch die Reaktionsgleichung



beschreiben. Die Nitrosierungsreaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In diesem Temperaturgebiet existiert gemäss



Distickstofftetroxid im Gleichgewicht neben Stickstoffdioxid¹². Obwohl auf Grund des schnellen Reaktionsablaufes mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln keine Aussagen über die kinetische Ordnung, Temperaturkoeffizienten und Aktivierungsparameter der Reaktion gemacht werden können, scheint es sinnvoll, auch hier wie im Fall der Umsetzung von Stickstoffdioxid mit Alkoholen^{14,15} bzw. Ammoniak¹⁶ in Distickstofftetroxid das eigentliche nitrosierende Agens zu sehen.

Aus der Tatsache, dass NO₂ bzw. N₂O₄ in der Lage ist, in einer schnellen Reaktion mit Diäthylamin in der Gasphase zu reagieren, lassen sich noch keine Aussagen darüber machen, in welchem relativen Ausmass NO₂ bzw. N₂O₄ bei Anwesenheit vergleichbarer Konzentrationen von Stickstoffmonoxid an der Nitrosaminbildung teilnimmt. Zur Beurteilung dieser Verhältnisse müssten Kenntnisse über die Kinetik der Nitrosierung von sekundären Aminen in der Gasphase sowohl durch N₂O₃ als auch durch NO₂ bzw. N₂O₄ vorliegen.

Um mögliche photochemische Einflüsse im Verlauf der Gasphasennitrosierung auszuschliessen, wurden einige Versuche bei völliger Dunkelheit durchgeführt. Die Ergebnisse waren im wesentlichen mit denen identisch, die im diffusen Tageslicht (übliches Fenster- und Gerätéglass) abliefen (Tabelle).

Gestützt auf Ähnlichkeiten im Reaktionsablauf, nehmen wir an, dass die Nitrosierung ebenso wie die Umsetzung mit Ammoniak und Alkoholen nach folgender allgemeiner Geschwindigkeitsgleichung verläuft

$$-\frac{d[\text{NO}_2]}{dt} = k_3 [\text{NO}_2]^2 [\text{A}]$$

(mit A = Ammoniak; ausgewählte primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole; Diäthylamin).

Nach der kleinsten, bei unserer Arbeitsweise experimentell noch realisierbaren Reaktionszeit von 2 bis 3 Min. ist bereits ein Umsatz von ungefähr 90% erreicht (Tabelle). Eine längere Beobachtung liefert vor allem eine Bestätigung der Konstanz der stöchiometrischen Bilanz. Das Verfahren ist nicht geeignet, die Kinetik der Reaktion in den Einzelheiten zu klären. Die beobachtete sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit lässt jedoch eine Bildung potentiell gefährlicher Nitrosaminmengen auch dann noch befürchten, wenn Amin und Stickoxide in niedrigen Konzentrationen nebeneinander vorliegen. Um die Ausbeuten erstmalig quantitativ berechnen oder zumindest halbquantitativ abschätzen zu können, waren wir bestrebt, einen Teil der durch die Experimente gewonnenen Information in einer Masszahl zu fassen, die es ermöglicht, modellmässige umweltchemische Berechnungen¹⁷ über die Nitrosaminbildung in der Atmosphäre vorzunehmen. Dazu wurde aus den Kurzzeitversuchen in Anlehnung an Yoffe und Gray¹⁴, Fairlie¹⁵ und Falk und Pease¹⁶ durch Integration der Geschwindigkeitsgleichung eine Grösse «k₃» berechnet, die die formalen Eigenschaften einer Geschwindigkeitskonstante 3. Ordnung besitzt. Es scheint uns gerechtfertigt, diesen Wert von «k₃» = 6,5 × 10⁸ l² Mol⁻² s⁻¹ als eine untere Schranke für die wirkliche Geschwindigkeitskonstante zu betrachten.

Experimentelles. In einer zu Aliquotierung, Dosierung und Umsetzung verschiedener gasförmiger Reaktanden geeigneten Glasapparatur wurde Stickstoffmonoxid nahezu quantitativ (Oxidationsgrad ≥ 99,9%) mit Luft oxidiert^{12,13}, aliquotiert und mit gasförmigem Diäthylamin bei 25 °C zur Reaktion gebracht. Der Transport der gasförmigen Komponenten erfolgte durch Ausströmenlassen in evakuierte Volumina; im Bedarfsfall wurde getrockneter Stickstoff (reinst) als Trägergas verwendet. Stickstoffmonoxid wurde aus einer kommerziellen Stahlflasche entnommen. Diäthylamin p.a. wurde getrocknet und frisch destilliert in eine Ampulle eingewogen und bei 10⁻¹

bis 10^{-2} Torr durch Zertrümmerung der Ampulle mittels Magneten in die Apparatur verdampft.

Stickstoff (reinst), Luft und Stickstoffmonoxid wurden vor dem Einströmen in die Reaktions- bzw. Aliquotierungsgefäße sorgfältig mit KOH und P_2O_5 -Bimsstein getrocknet. Alle Schliffverbindungen und Vakuumhähne wurden mit einem Präparat der Firma Halocarbon Product Corporation (USA), «Halocarbon 25-5 S Grease», eingefettet. Zur Druck- bzw. Vakuummessung kamen je nach dem zu messenden Bereich Pirani-, McLeod- oder Huygens-Manometer bzw. ein einfaches, mit Quecksilber gefülltes U-Rohr zum Einsatz. Vor jeder Umsetzung erfolgte ein Ausheizen der Reaktions- bzw. Aliquotierungsgefäße bei 10^{-1} bis 10^{-2} Torr, um an den Glaswänden adsorptiv gebundenes Wasser weitgehend zu entfernen. *Analytik.* Nach entsprechenden Reaktionszeiten wurden Diäthylnitrosamin, unumgesetztes Stickstoffdioxid sowie das als Aerosol anfallende Diäthylammoniumnitrat durch intensives Schütteln des geschlossenen Reaktionskolbens mit 0,1 N Kalilauge in die wässrige Phase übergeführt. Unumgesetztes Stickstoffdioxid wurde – nach Absorption in 0,1 N KOH, Diazotierung mit Sulfanilsäure und Kupplung mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin – als Azofarbstoff bei 540 nm bestimmt.

Im NO_2 -Konzentrationsbereich von 20 bis 250 ppm wurde unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen der Umwandlungsgrad von Stickstoffdioxid zu

Nitrit bzw. zum Azofarbstoff untersucht. In diesem Bereich wurde ein konzentrationsunabhängiger Wert von 0,64 («Saltzman-Faktor») gefunden.

Nitrat wurde nach einem von Sawicki und Scaringelli beschriebenen¹⁸ und von uns modifizierten Verfahren¹⁹ analysiert, wobei die zuvor ermittelten Nitrit- und Nitrosaminkonzentrationen berücksichtigt wurden. Diäthylnitrosamin wurde nach Wasserdampfdestillation und katalytischer Spaltung im wässrigen, alkalischen Milieu ebenfalls spektralphotometrisch bestimmt¹⁹. Die Identität des gebildeten Diäthylnitrosamins wurde dünn-schichtchromatographisch²⁰ durch Vergleich mit authentischen Referenzproben bestätigt. Diäthylammoniumnitrat wurde spektralphotometrisch¹⁹ (Nitrat) und durch Nitrosierung²¹ (Diäthylamin) mit nachfolgender Dünn-schichtchromatographie bzw. katalytischer Spaltung charakterisiert.

- 16 F. Falk und R. N. Pease, J. Am. chem. Soc. 76, 4746 (1954).
- 17 W. Rolle, Vortrag vor der Klasse «Umweltschutz und Umweltgestaltung» der AdW der DDR, Feb. 1976. Akademie-Verlag Berlin, im Druck.
- 18 C. R. Sawicki und F. P. Scaringelli, Microchem. J., N.Y. 16, 657 (1971).
- 19 W. Rolle und P. Gehlert, Z. Chem. 14, 157 (1974).
- 20 N. P. Sen und C. Dalpe, Analyst 97, 216 (1972).
- 21 P. Gehlert und W. Rolle, Z. Chem. 16, 145 (1976).

Correlation between serum dopamine- β -hydroxylase activity and dopamine- β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase activities in central and peripheral adrenergic neurons and adrenal glands

T. Nagatsu, T. Kato, Y. Numata(Sudo), K. Ikuta, M. Sano, I. Nagatsu, T. Takeuchi, M. Matsuzaki and H. Umezawa

Laboratory of Cell Physiology, Department of Life Chemistry, Graduate School at Nagatsuda, Tokyo Institute of Technology, Tokyo (Japan); Departments of Biochemistry and Anatomy, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, Nagoya (Japan); Department of Anatomy, School of Medicine, Fujita-Gakuen University, Toyoake, Aichi (Japan); and Institute of Microbial Chemistry, Tokyo (Japan), 21 September 1976

Summary. Serum dopamine- β -hydroxylase activity in spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats had a positive correlation with dopamine- β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase activities in mesenteric vessels, vas deferens, and adrenal glands at 14–16 weeks of age, a negative correlation with dopamine- β -hydroxylase activity in locus coeruleus at 3 weeks and 14–16 weeks of age, and a positive correlation with tyrosine hydroxylase activity only at 3 weeks of age, but not at 14–16 weeks of age.

Since dopamine- β -hydroxylase (DBH) is secreted into blood from the nerve endings of the sympathetic nerves together with noradrenaline¹, it is speculated that serum DBH activity can be an index of the peripheral sympathetic nerve activity. However, serum DBH activity appears to be an insensitive index of acute changes of the sympathetic nerve activity as compared with the noradrenaline level in blood². One question is whether or not serum DBH can express the changes of sympathetic nerve activity during a long-term period such as during the onset of hypertension.

We have examined the relation between the serum DBH activity, which is mainly derived from the peripheral sympathetic nerve terminals, and the DBH and tyrosine hydroxylase (TH) activities in the peripheral sympathetically innervated tissues, adrenal glands, and in the catecholaminergic regions of brain with spontaneously hypertensive (SH) rats and control Wistar-Kyoto rats during the development of hypertension, in order to evaluate the significance of serum DBH activity as an index of peripheral and central noradrenergic neuronal activity.

The SH rats³ and Wistar-Kyoto rats examined were at 3, 14 and 16 weeks of age. They were kindly supplied by Drs Okamoto and Yamori (Kyoto University, Kyoto) and raised in our laboratory under the same conditions. The mean values of DBH and TH activities in tissues of rats at 3 weeks⁴ and 14 weeks⁵ were reported previously. Rats were decapitated, and mesenteric vessels, vas deferens, adrenal glands and brain were quickly removed, weighed, frozen on dry ice and stored at $-80^{\circ}C$. 'Mesenteric vessels' consist of superior, inferior and coeliac mesenteric arteries and veins plus connective tissues after removing fat from the mesentery. Blood samples were

- 1 J. Axelrod, Pharmac. Rev. 24, 233 (1972).
- 2 L. Geffen, Life Sci. 14, 1593 (1974).
- 3 K. Okamoto and K. Aoki, Jap. Circul. J. 27, 282 (1963).
- 4 T. Nagatsu, K. Ikuta, Y. Numata(Sudo), T. Kato, M. Sano, I. Nagatsu, H. Umezawa, M. Matsuzaki and T. Takeuchi, Science 191, 290 (1976).
- 5 T. Nagatsu, T. Kato, Y. Numata(Sudo), K. Ikuta, H. Kuzuya, H. Umezawa, M. Matsuzaki and T. Takeuchi, Experientia 31, 767 (1975).